



Offenlegungsschrift 25 54 407

(11)

(21)

(22)

(43)

Aktenzeichen: P 25 54 407.4

Anmeldetag: 3. 12. 75

Offenlegungstag: 10. 6. 76

(30)

Unionspriorität:

(32) (33) (31)

4. 12. 74 USA 529329

46441X/25	D16	RETO 04.12.74	D5-C3.	1	85
REYNOLDS TOBACCO CO		*DT 2554-407			
04.12.74-US-529329 (10.06.76) C12d-13/10 C12k					
Heat-stable lactase prepn. - by cultivating <i>Bacillus coagulans</i> in lactose-contg. nutrient medium and pref use in lactose hydrolysis (BE030676)					
<p>Heat-stable lactase prepn. by cultivating a <i>Bacillus</i> species organism in a lactose-contg. nutrient medium takes place by using an organism which has optimum growth at $>45^{\circ}\text{C}$, pref. a <i>Bacillus coagulans</i> NRRL B-8100, and pref. cultivating it in a nutrient medium at $\geq 40^{\circ}\text{C}$.</p>					
<p><u>USE</u></p> <p>Lactase obtd. is pref. used in hydrolysing lactose in prodn. of glucose and galactose. Process is esp. useful in dealing with lactose intolerance in man or domestic pets.</p>					
<p><u>ADVANTAGE</u></p> <p>Heat-stable lactase allows lactose hydrolysis to proceed under conditions which are unfavourable for growth of bacteria present in milk or milk products. Optimum lactase activity is at $60-65^{\circ}\text{C}$.</p>					
<p><u>DETAILS</u></p> <p>Lactase obtd. has optimum enzyme activity at pH 6. Lactose hydrolysis pref. takes place by contacting with lactase obtd. at pH 4-8 and $45-65^{\circ}\text{C}$.</p>					
<p>EXAMPLE</p> <p>Medium for cultivating <i>Bacillus coagulans</i> in lactase prepn. contained 1% proteose peptone, 1% yeast extract, 0.8% KH_2PO_4, 2% sterilised lactose, at pH 6. Cultures were incubated 48 hrs. at 45°C, followed by addn. of 0-5 vol.% toluene, stirring, cell recovery by flocculation and drying at 55°C. Lactase activity of dried aggregate particles was 38.5 units/g. Lactase was used for hydrolysis of lactose in a sweet whey fodder compan. 5 g dried aggregate particles having size 1.19 mm to 0.84 mm were hydrated in a 50% lactose soln., buffered at pH 7 and packed in a glass column at 60°C. An aq. soln. contg. 70 g/l dry, sweet whey powder was passed through, at pH 7. Fodder soln. contained 5 wt.% lactose. Flow rate was kept at 375 ml/day. Degree of lactose hydrolysis fell to 80% after 3 weeks continuous operation. (11 pp.).</p>					
46441X					

435-200

27 470

R. J. Reynolds Tobacco Company
Winston Salem, N.C. (USA)

Herstellung thermostabiler Lactase

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Lactase aus einem wärmetoleranten (der zur Gattung *Bazillus* gehört).

Seit einigen Jahren besteht ein beträchtliches Interesse zu entwickeln, nach denen die Lactosemengen und aus Milch hergestellten Produkten reduziert werden. Dieses Interesse wurde noch erhöht, weil neuere Befunde gegeben wurden, daß ein großer prozentualer Teil der Bevölkerung an einem Lactase-Mangel leidet, der

609824/0950

di Vererbung oder auf den Alterungsprozeß zurückzuführen ist. Solche Lactasemängel führen zu Darmbeschwerden, wenn beispielsweise die Diätmengen an Lactose hoch sind. Eine ähnliche Lactoseintoleranz ist auch an bestimmten Haustieren beobachtet worden.

Die Hydrolyse von Lactose in Milch und in aus Milch hergestellten Produkten zu Glukose und Galactose ist ein gestecktes Ziel, nicht nur, weil es das Problem der Lactoseintoleranz lösen würde, sondern auch, weil es die Süßigkeit der Produkte erhöhen und die sogenannten sandigen Texturen in bestimmten, aus Milch hergestellten Produkten, die durch Lactosekristallisation hervorgerufen werden, reduzieren würde. Jene, die auf diesem Gebiet arbeiten, schätzen schon lange den Nutzen, der durch eine Hydrolyse unter Verwendung von Lactase bewirkt werden könnte. Trotz der Tatsache, daß Lactase in der Natur ziemlich weit verbreitet ist und von vielen Mikroorganismen produziert wird, war bisher die Verwendung von Lactase bei der handelsüblichen Herstellung von Milch und Milchprodukten nur begrenzt möglich. Ein Grund für die begrenzte kommerzielle Verwendung von Lactase ist der, daß viele der handelsüblichen Lactasen, wie beispielsweise jene, die aus Hefe hergestellt werden, ihre optimale enzymatische Aktivität erst bei Temperaturen entfalten, die auch das Wachstum von Bakterien begünstigen. Entsprechend hat es ein wachsendes Interesse dafür gegeben, eine Lactase zu finden, die einen hohen Grad an Wärme-stabilität aufweist. Eine solche wärmestabile Lactase würde es ermöglichen, die durchzuführende Lactosehydrolyse unter Bedingungen durchzuführen, die für das Wachstum bestimmter Bakterien, die im allgemeinen in der Milch oder Milchprodukten zugegen sind, ungünstig sind. Eine solche Lactase, die aus *Streptomyces coelicolor* gewonnen wurde, ist kürzlich in der US-PS 3 816 259 beschrieben worden. Zu diesem Zeitpunkt ist es jedoch nicht klar, ob Lactase aus *S. coelicolor* gefahrlos verwendet werden kann, weil bestimmte Glieder dieser Arten Antibiotika produzieren sollen.

DT 2554407 A1

609824/0950

Die Herstellung von Lactase durch einzelne Mitglieder der Gattung *Bazillus* ist schon berichtet worden. P. J. Anema hat in *Biochim. Biophys. Acta* 89 (3), 495-502 (1964) die Isolierung von Lactase aus *B. subtilis* beschrieben. Lactase aus *B. megaterium* wurde schon von S.R. Rohlfing und I.P. Crawford in *J. Bacteriology* 92 (4), 1258-9 (1966) beschrieben. Keiner dieser Organismen wird jedoch als wärmetolerant angesehen, und die aus diesen Stämmen hergestellte Lactase muß im allgemeinen bei Temperaturen unterhalb von etwa 50°C verwendet werden, um eine wirksame Enzymaktivität über einen längeren Zeitraum beizubehalten.

Erfindungsgemäß wird nun ein Verfahren zur Herstellung einer Lactase geschaffen, die verbesserte Wärmestabilität aufweist, indem ein Organismus, der zur Gattung *Bazillus* gehört, in einem Nährmedium, das Lactose enthält, kultiviert wird und die dabei erzeugte Lactase gewonnen wird, wobei der Organismus zu denen gehört, die ein optimales Wachstum bei einer Temperatur von wenigstens etwa 45°C aufweisen.

Ein bevorzugter Organismus zur Verbindung, gemäß der vorliegenden Erfindung, wurde aus einer Bodenprobe isoliert.

Die Kultivierung des Organismus in einem geeigneten Nährmedium, welches Lactose enthält, ergibt die gewünschte Lactase auf intracellulärem Wege. Es wurde eine Charakterisierung dieser Kultur durchgeführt und es wurde gefunden, daß sie zur Art *Bazillus coagulans* gehört, entsprechend der Klassifikation, die in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th Edition gegeben wird. Dieser Organismus wurde bei der Kulturkollektion der U.S.D.A. Northern Regional Research Laboratory unter der Bezeichnung NRRL B-8100 hinterlegt. Die Klassifizierungseigenschaften dieses Stammes sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 1

A) Morphologische Charakteristika

1. Vegetative Stäbchen: Weniger als $0,9 \mu$ im Durchmesser, variierende Längen, die im allgemeinen bis zu $5,0$ bis $6,0 \mu$ reichen. Einige Fäden. Nicht in Ketten. Gramm-positiv, gleichmäßige Färbung. Freibeweglich.
2. Sporenträger: Im allgemeinen nicht geschwollen, aber gelegentlich können geschwollene Sporenträger gefunden werden.
3. Sporen: $0,9$ zu $1,2$ zu $1,5 \mu$, ellipsoid, sub-terminal bis terminal.

B) Kulturcharakteristika

1. Gelantine-Agar Aufstreich-Impfungsplatte -- keine Hydrolyse.
2. Agarkolonien -- opak, klein, rund. Nicht unterschiedlich.
3. Agar-Schrägflächen -- kärglich bis mäßiges Wachstum. Flach, glatt, opak.
4. Glukose-Agar-Schrägfläche -- Wachstum stärker als auf Nähragar. Glatt weiß.
5. Glukose-Asparagin-Agar-Schrägflächen -- Kein Wachstum nach 24 Stunden. Mäßiges Wachstum bei 48 Stunden.
6. Proteose-Pepton-Säureagar-Schrägflächen -- Gutes Wachstum, besser als auf Agarnährmedium.

7. Sojabohnen-Agar-Schrägflächen -- Mäßiges Wachstum, ein wenig stärker als auf Agarnährmedium.
8. Vorratskultur-Agar-Schrägflächen -- Wachstum kärglich nach 24 Stunden, so gut wie Agarnährmedium nach 48 Stunden.
9. Brühe -- Wachstum schlecht nach 24 Stunden.
10. Natriumchloridbrühe -- kein Wachstum in 7%igen Natriumchlorid
11. Milch-Agar-Aufstreichimpfungsplatte -- Keine Hydrolyse.
12. Kartoffel -- Kärglich, trocken, schrumpelig.

c) Physiologische Charakteristika

1. Bei Verwendung von Pepton als Stickstoffquelle produzierte der Organismus Säure aber kein Gas aus Glukose, Lactose, Arabinose, Xylöse, Mannitol und Maltose. Es bestand eine neutrale Reaktion aus Sucrose und Glyzerin.
2. Der pH-Wert von Glukosebrühe betrug 5,0 oder weniger in sieben Tagen.
3. Zitrone wurden nicht verwendet.
4. Tomaten, Hefe, Milch geronnen in 24 Stunden bei 45°C.
5. Nitrite wurden nicht aus Nitraten hergestellt.
6. Der Voges-Proskauer Test war negativ. Der Ph-Wert der Voges-Proskauer Brühe betrug 4,2.
7. Die Hydrolyse von Stärke - positiv.

8. Katalase - positiv.
9. K in Wachstum in einem Nitratmedium unter anaeroben Bedingungen. Wachstum in Glukosebrühe unter anaeroben Bedingungen ergibt einen pH-Wert von weniger als 5,2 in 7 Tagen.
10. Aerob, gegebenenfalls anaerob.
11. Die minimale Temperatur für das Wachstum beträgt 25°C. Die Maximaltemperatur für das Wachstum liegt bei 60°C. Optimales Wachstum tritt bei 45-50°C auf.

Wie unter den physiologischen Charakteristika in Tabelle 1 aufgeführt wurde, zeigt der hierin offenbarte Bazillus-organismus ein optimales Wachstum bei Temperaturen von etwa 45 bis 50°C und ist deshalb als wärmetoleranter Organismus anzusehen, im Vergleich mit anderen Bazilli, die ein optimales Wachstum bei etwa 37°C zeigen. Ein wärmetoleranter Bazillus-organismus soll deshalb ein solcher sein, der ein optimales Wachstum bei Temperaturen von etwa 45°C und darüber aufweist.

Beispiel

Das pH-Optimum der mit Hilfe von diesem Organismus hergestellten Lactase, wurde bestimmt, indem ganze Zellen in Gegenwart von o-Nitrophenyl- β -Glactosid (ONPG) als Substrat geprüft wurden. Das Verfahren war im wesentlichen das, welches von J. Lederberg in J. Bacteriology 60, 381 (1950) geschrieben wurde. Die Zellen wurden zunächst mit Toluol behandelt; es wurde ein Phosphatpuffer verwendet und die Prüftemperatur betrug 37°C. Die Lactaseaktivität wurde im Bereich von etwa pH von 4,5 bis 8,0 beobachtet, wobei die optimale Aktivität bei etwa pH 6,0 auftrat.

Die Stabilität des Lactaseenzym, welches von *B. coagulans* hergestellt wurde, wurde geprüft, indem ONPG als Substrat in einer Modifikation des Lederberg-Verfahrens verwendet wurde. Für diese Prüfung wurden gewaschene Zellen in 0,05 molarem Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7,0 in Gegenwart des ONPG-Substrates suspendiert. Die Suspension wurde dann 4 Tage lang bei 60°C belassen, während periodisch Proben entnommen wurden, um die verbliebene Lactaseaktivität zu bestimmen. Die Temperatur für diesen Stabilitätstest wurde so ausgewählt, daß sie in etwa bei den Temperaturen, die für die Niedrigtemperaturenpasteurisierung angewendet werden, lagen. Die Testergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2

<u>Zeit in Stunden</u>	<u>Lactaseaktivität als Prozent der Anfangsaktivität</u>
0	100
21	92
45	51
71	36
99	20

Die durch *Bazillus coagulans* hergestellte Lactase zeigt eine wirksame Enzymaktivität bis zu etwa 70°C. Die optimale Aktivität scheint bei Temperaturen von 60 bis 65°C aufzutreten. Die bestimmte Temperatur, die für die Lactosehydrolyse unter Verwendung dieses Enzyms ausgewählt wird, wird in gewissem Grade von dem verwendeten Substratmedium abhängen. Im allgemeinen sind jedoch Temperaturen zwischen etwa 45 und 65°C bevorzugt.

Ein typisches Medium zum Kultivieren von *Bazillus coagulans* zur Herstellung von Lactase ist wie folgt:

Proteose Pepton	1,0 %
Hefeextrakt	1,0 %
Kaliumdihydrogenphosphat	0,8 %
Lactose (getrennt sterilisiert)	2,0 %
pH-Wert	6,0

Kulturen werden auf einer Kreis-Schüttelvorrichtung 48 Stunden lang bei 45°C gebrütet. Am Ende dieser Inkubationszeit wird Toluol zur Brühe (0,5 Volum% pro Volumenbasismaterial) hinzugegeben und das Gemisch 30 Minuten lang kräftig gerührt. Zellen werden dann durch Ausflockungsverfahren, wie sie in der US-PS 3 821 086 beschrieben wurden, gewonnen und das dabei erhaltene ausgeflockte Zellaggregat bei 55°C getrocknet. Die Lactaseaktivität der getrockneten Aggregatteilchen betrug 38,5 Einheiten pro Gramm, wobei eine Einheit als die Enzymmenge definiert ist, die notwendig ist, um ein Mikromol-Dextrose pro Minute unter den Versuchsbedingungen herzustellen. Das für diese Bestimmung angewendete Testverfahren ist das von Weetall et al, wie es in Biotechnology und Bioengineering 16, 295 (1974) veröffentlicht wurde.

Die Effektivität der mit Hilfe von *Bazillus coagulans* hergestellten Lactase, wurde durch die Hydrolyse von Lactose in einem süßen Molkenfuttermittel bestimmt. Der Organismus wurde kultiviert und die Zellen wurden, wie oben beschrieben, gewonnen. Die getrockneten Aggregatteilchen wurden gesiebt und 5 g des Anteiles mit einer Größe von 1,19 mm bis 0,84 mm (16 bis 20 mesh) wurde in einer 50%igen Lactoselösung, die mit einem 0,05 molaren Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7,0 gepuffert war, hydratisiert. Die hydrathaltigen Teilchen wurden dann in eine kleine Glassäule gepackt, die bei einer Temperatur von 60°C gehalten wurde. Durch diese gepackte Säule wurde kontinuierlich eine wässrige Lösung, die 70 g eines handelsüblichen trocknen süßen Molkenpuders pro Liter enthielt, hindurchgegeben, wobei die Lösung mit 0,05 molarem Phosphat bei einem pH-Wert von 7,0

gepuffert war. Die Futterlösung enthielt etwa 5 Gew.-% Lactose, bezogen auf den Lactosegehalt der süßen Molke, wobei 100 mg pro Liter Methyl p-Hydroxybenzoat als Konservierungsmittel zugegeben waren. Die Strömungsrate durch die Säule wurde bei 375 ml pro Tag gehalten und der Grad der Lactosehydrolyse wurde täglich durch Routineanalyse überwacht. Der Anfangsgrad der Lactosehydrolyse lag bei 90 %. Nach 3 Wochen kontinuierlichen Betriebes war der Grad der Lactosehydrolyse auf 80 % abgesunken.

Es versteht sich, daß die erfindungsgemäß hergestellte Lactase sowohl für die ansatzweise als auch für kontinuierliche Behandlung von Lactosesubstratmedien verwendet werden kann. Außerdem kann die Lactase eingesetzt werden, indem die Zellen direkt verwendet werden oder sie kann verwendet werden in Form von zellfreiem Enzym, in-dem den Fachleuten bekannte Verfahren angewendet werden.

P a t e n t a n s p r ü c h e -

- ① Verfahren zur Herstellung von Lactase mit verbesserter Thermostabilität, indem man einen Organismus, der zur Gattung *Bazillus* gehört, in einem Nährmedium, das Lactose enthält, kultiviert und die dabei hergestellte Lactase gewinnt, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus ein solcher ist, der optimales Wachstum bei einer Temperatur von wenigstens etwa 45°C entfaltet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus in einem Nährmedium bei einer Temperatur von wenigstens 40°C kultiviert wird.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die erhaltene Lactase eine optimale Enzymaktivität bei einem pH-Wert von etwa 6,0 entfaltet.
4. Verfahren zum Hydrolysieren von Lactose zur Herstellung von Glukose und Galactose, dadurch gekennzeichnet, daß Lactose mit einer nach einem der obigen Ansprüche 1 bis 3 hergestellten Lactase in Kontakt gebracht wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lactose mit der Lactase bei einem pH-Wert zwischen 4,0 und 8,0 und bei einer Temperatur zwischen etwa 45 und 65°C in Kontakt gebracht wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus zur Art *Bazillus coagulans* gehört.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus NRRL B-8100 ist.

609824/0950